

## TÍTULO

**Crecimiento micelial y caracterización macro y microscópica de cepas nativas del hongo comestible Asam (*Schizophyllum commune* Fr.)**

## I. INDICE



## II. ÁMBITO DE LA INVESTIGACION (UBICACIÓN DENTRO DEL PROYECTO MACRO)

**A.** Título del Proyecto Macro:

Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas del hongo comestible Asam (*Schizophyllum commune* Fr.)

**B.** Nombre del Coordinador del proyecto:

Licda. María del Carmen Bran González

**C.** Título del proyecto del estudiante:

Crecimiento miceliar y caracterización macro y microscópica de cepas nativas del hongo comestible Asam (*Schizophyllum commune* Fr.)

**D.** Nombre del asesor

Lic. Osberth Isaac Morales Esquivel

**E.** Ubicación dentro del Proyecto Macro

Determinar el medio de cultivo y la temperatura donde se observe el mayor crecimiento miceliar de las cinco cepas, así como la caracterización macro y microscópica de las mismas, cumpliendo con la primera fase de la investigación del proyecto macro.

**F.** Duración del proyecto:

Seis meses de febrero a julio del presente año.

**G.** Unidad académica responsable:

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia

**H.** Centro de investigación:

Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas -IIQB-

**I.** Financiamiento:

- PROYECTO PUIDI 6.49, Dirección General de Investigación, Programa Universitario de Investigación en Desarrollo Industrial –PUIDI- (Línea de investigación: procesos innovadores de producción industrial).
- Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.

### III. RESUMEN

*Schizophyllum commune* es un hongo que se consume y vende en grandes cantidades en los mercados de los municipios de Cobán y Tactic (Alta Verapaz), Jacaltenango y San Mateo Ixtatán (Huehuetenango), Tecpán (Chimaltenango), así como en el departamento de Petén. En estas localidades tiene gran popularidad y es muy apreciado, al igual que en otros países como México.

En el país, gracias al financiamiento otorgado por la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han aislado cepas nativas de esta especie, a partir de especímenes provenientes de las localidades donde se comercializa y se utiliza como alimento. Estas cepas deben ser evaluadas en base a su crecimiento en diferentes medios de cultivo y temperaturas, describiendo sus características macro y microscópicas.

En este estudio se utilizaron los medios de cultivo PDA, EMA y CZD. Se evaluaron las cepas 108.01, 46.02, 296.02, 52.03 y 30.07, a 18°C y 26°C para determinar el medio y temperatura donde presentarían el mayor crecimiento miceliar. Se determinó que la cepa 52.03, debe cultivarse en el medio PDA, tanto a 18°C como a 26°C, mientras que para las cepas 108.01 y 296.02 las condiciones más apropiadas fueron los medios EMA a 18°C y en PDA a 26°C. Asimismo, para las cepas 30.07 y 46.02 el medio más adecuado fue EMA a ambas temperaturas de incubación.

Las colonias de las cepas estudiadas en los medios EMA y PDA, presentaron anverso de color blanco y textura algodonosa con regular o abundante micelio aéreo, bordes definidos y un crecimiento miceliar radial, circular o casi circular. En el medio CZD desarrollaron colonias con "micelio caótico" (laxo, escaso micelio aéreo y forma no definida) tanto a 18°C como a 26°C. La mayoría de las cepas presentaron colonias con reverso sin ningún cambio de coloración.

Al ser cultivadas en los medios EMA y PDA a 26°C de incubación, todas las cepas presentaron exudado. Los olores percibidos fueron afrutados, fermentados y desagradables en ambas temperaturas.

Microscópicamente, todas las cepas presentaron minúsculas proyecciones sobre las paredes hifales (espículas), fíbulas e hifas entre 1.0 a 9.0  $\mu\text{m}$  y solamente la cepa 46.02 no mostró la formación de clamidosporas.

En conclusión, el medio de cultivo donde las cepas evaluadas obtuvieron el mayor crecimiento micelial fue AEM a 18°C, mientras que el medio PDA lo fue a 26°C.

Finalmente, se recomienda evaluar las cinco cepas de *S. commune* en otros medios de cultivo y temperaturas para documentar una mayor cantidad de características fisiológicas de las mismas, así como estudiar la producción de inóculo y cuerpos fructíferos, para documentar su productividad. Asimismo, dado que *S. commune* es usado en la medicina tradicional, se deben estudiar sus propiedades medicinales.

#### IV. INTRODUCCION

*Schizophyllum commune* es una, de las más de cien especies de hongos comestibles, que se conocen en el país. Este hongo se consume y vende en grandes cantidades en los mercados de los municipios de Cobán y Tactic (Alta Verapaz), Jacaltenango y San Mateo Ixtatán (Huehuetenango), Tecpán (Chimaltenango), así como en el departamento de Petén. En estas localidades tiene gran popularidad y es muy apreciado, tal como se ha observado en otros países como México.

En Guatemala, gracias al financiamiento otorgado por la Universidad de San Carlos de Guatemala a la Unidad de Biodiversidad, Tecnología y Aprovechamiento de Hongos, del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, se ha documentado la importancia etnomicológica de la especie, además se han aislado cepas nativas de diversas localidades donde se utiliza tradicionalmente como alimento.

Estas cepas nativas tienen la factibilidad de ser cultivadas, usando para ello, la gran cantidad de residuos de madera que genera la industria maderera en el país. Al implementar el cultivo de *S. commune*, este se podría promover en las comunidades campesinas, las cuales utilizarían los basidiomas producidos como una fuente alimenticia y económica, que contribuiría a su desarrollo.

Por tal razón, este trabajo tuvo por objeto caracterizar fisiológicamente las cepas nativas, evaluándolas en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación, para determinar las condiciones en las cuales las cepas crecieron más rápidamente y produjeron estructuras microscópicas que garantizaron el estado dicariótico del micelio (fíbulas), con la finalidad de lograr el cultivo de *S. commune* bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

## V. ANTECEDENTES

### A. Generalidades de los hongos

Los hongos forman un grupo taxonómico independiente de los vegetales y los animales, al cual se le denomina Reino Fungi. Los organismos que lo conforman son heterótrofos, inmóviles, poseen talos unicelulares o filamentosos rodeados por paredes celulares y se reproducen por esporas sexuales y asexuales. De acuerdo con el tamaño de las fructificaciones que producen, se pueden clasificar en macrohongos y microhongos, según sean macroscópicos o microscópicos, respectivamente, e incluso existen microhongos que no producen fructificaciones (1).

Actualmente, los micólogos han tenido un progreso sin precedente al elaborar una clasificación filogenética de los hongos, basada en análisis de ADN, que los evidencia como organismos polifiléticos con morfologías convergentes, pero que derivaron independientemente de varios linajes eucarióticos. Clasificándose en cuatro phyla: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Ascomycota* y *Basidiomycota* (1).

El número de hongos en el mundo suponen 1.5 millones de especies, de manera que, si este estimado es correcto, se han descrito menos del 5 por ciento de ellas (2). Esto se debe a que aún se tiene información incompleta de muchas especies, ya que los hongos y los grupos parecidos a los hongos (mohos acuáticos, Reino Straminipila, mohos limosos y relacionados, Reino Protista) comprenden una asombrosa variedad de taxa, estrategias de vida y morfologías (desde las formas similares a amebas y chytridiomycetes acuáticos unicelulares, hasta los grandes hongos basidiomycetes) (3).

Los hongos se cuentan entre los más importantes en el mundo, no solo por el papel vital en la función de los ecosistemas, sino que además son esenciales e incluso cruciales en actividades como la descomposición, reciclamiento y transporte de nutrientes y son indispensables para el desarrollo sostenible del ambiente. Algunas especies son patógenas importantes de plantas y animales,

mientras que otras forman simbiosis obligadas con algunas especies de plantas, algas, cianobacterias y animales (3).

Muchos hongos también tienen una gran importancia económica. Aquellos que se han domesticado se utilizan en la elaboración de cerveza, en cocina, fermentación industrial y biotecnología, algunas otras especies se cultivan o se recolectan para ser utilizadas como alimento (4).

## **B. Hongos Comestibles**

Los hongos comestibles se conocen desde tiempos inmemoriales. Se estima que cerca de 7,000 especies poseen varios grados de comestibilidad y más de 3,000 especies de 31 géneros se consideran como las principales comestibles (5).

### **1. Morfología**

Los hongos comestibles se consideran macrohongos y se pueden encontrar principalmente en el grupo Basidiomycota. Los cuerpos fructíferos de este grupo pueden ser carnosos, gelatinosos o pulverulentos y tener forma de sombrilla, oreja, repisa, trompeta, coral, etc.; y poseen basidios, que son estructuras microscópicas especializadas sobre las cuales se producen las esporas (basidiosporas) (6).

El típico cuerpo fructífero posee un píleo (sombrero), himenóforo (estructura que sostiene la capa fértil, ya sea lamelas, tubos, etc.), contexto y estípite. Los cuerpos fructíferos sésiles que no tienen estípite no son comunes, como en el caso de las llamadas “orejas de palo”, que se adhieren lateralmente al sustrato; “costras” que no tienen píleo ni estípite y unos cuantos con características únicas de ellos o típicas de la familia, género o especie a los que pertenecen (6).

### **2. Ciclo de vida**

Las basidiosporas de los hongos comestibles germinan cuando entran en contacto con un sustrato, encontrando temperatura, pH y humedad adecuados para su crecimiento. Dan origen a un micelio primario bien desarrollado,

conocido como homocarión por tener un solo tipo de núcleos generalmente haploides. En algunas especies donde únicamente hay un núcleo por compartimiento hifal se le llama monocarión. En estos casos, los términos se utilizan como sinónimos. En la mayoría de los basidiomycetes el micelio homocarión no fructifica, pero es capaz de crecer vegetativamente. Ciertos tipos de hongos comestibles, pueden formar esporas asexuales del tipo oidio que al germinar dan origen a micelio homocarión. En otros casos los oidios funcionan como gametos masculinos y se unen a hifas de micelio compatible para formar el micelio heterotálico, típico de la reproducción sexual (7).

Para que el cuerpo fructífero se desarrolle, es necesario que dos micelios homocarióticos compatibles se fusionen y por disolución de la pared del punto de contacto, formen compartimentos hifales de citoplasma continuo y con dos tipos de núcleos provenientes cada uno de los compartimentos que se fusionaron. Es a partir de estos, que por divisiones conjugadas de ambos tipos de núcleos y su posterior migración hacia los compartimentos de compatibilidad sexual contraria al núcleo que migra, se forma el micelio heterocarión o dicarión. A este tipo de micelio también se le conoce como micelio secundario. En la mayoría de casos, este micelio presenta en cada septo una estructura lateral conocida como conexión grapa o fíbula. El micelio que presenta este tipo de estructura frecuentemente se identifica como heterocarión y el que no las tiene como homocarión. Esto no es del todo verdadero, pues en un buen número de hongos el heterocarión no las forma (7).

El micelio heterocarión es capaz de crecer vigorosamente y de multiplicarse vegetativamente en esta condición de forma indefinida. Aún cuando la inducción y la formación de los basidiocarpos o setas son regulados por la interacción de un gran número de factores, se pueden mencionar que estas son favorecidas por los cambios bruscos de humedad y concentración de  $\text{CO}_2$  (7).

La cariogamia de los núcleos que forman el micelio heterocariótico, se presenta en las puntas de las hifas que forman la capa fértil del basidiocarpo (himenio), dando origen a basidios monocarióticos y diploides. Posteriormente el núcleo ( $2n$ ) presenta meiosis y da origen a cuatro núcleos haploides ( $1n$ ) que migran hacia los esterigmas, para formar las basidiosporas generalmente haploides y con un solo tipo de núcleo (7).

Las basidiosporas maduras son liberadas y pueden ser diseminadas por el viento, insectos, agua, animales y otros factores, para dar origen a hifas somáticas uninucleadas e iniciar nuevamente el ciclo de vida del hongo (7).

### **3. Valor nutricional**

Los análisis de la composición de los hongos cultivados han revelado que los hongos comestibles son ricos en proteínas y carbohidratos, moderados en fibra, cenizas y bajos en grasas. Su valor energético es bajo y son una buena fuente de aminoácidos esenciales, vitaminas y minerales. El potasio y el fósforo son dos elementos dominantes en la porción mineral. Los hongos contienen una porción sustancial de tiamina, riboflavina, niacina y de vitamina B<sub>2</sub>. En 100g de proteína cruda hay 32 a 48g de nueve aminoácidos esenciales. De estos, la lisina es la más abundante, mientras que las cantidades de triptófano y metionina son bajas (5).

### **C. Cultivo de hongos comestibles**

Se estima que el primer intento por cultivar hongos tuvo lugar en China hace 1,400 años. La primera especie cultivada fue *Auricularia auricula*, la siguiente fue *Flammulina velutipes*, la cual se cultivó 200 a 300 años después y la tercera fue *Lentinula edodes* (5).

Los hongos pueden ser cultivados a través de una variedad de métodos. Algunas técnicas son simples y requieren de poca o casi nada de experiencia por parte del cultivador. Otros, demandan técnicas sofisticadas ya que incluyen

procedimientos como el cultivo de tejido estéril. Los métodos simples toman poco tiempo, pero también requieren mayor paciencia por parte del cultivador. A medida que se progresa hacia métodos más técnicos la probabilidad de éxito se ve incrementada (8).

El cultivo de hongos comestibles requiere el cumplimiento de diferentes fases las cuales comprenden: a) selección del hongo, b) determinación de los requerimientos para el cultivo, c) producción de inóculo, d) preparación del sustrato, e) desarrollo del micelio y f) desarrollo de los cuerpos fructíferos (5, 7).

El uso extensivo de las técnicas mecanizadas para cultivo de hongos como alimento, en grandes cantidades, es un fenómeno del siglo XX. Actualmente en el mundo se han estudiado, para fines de cultivo, alrededor de 200 especies, de las cuales aproximadamente 60 se cultivan comercialmente y cerca de 10 se cultivan a escala industrial. Las 10 especies cultivadas más populares a nivel mundial son *Agaricus bisporus/bitorquis*, *Auricularia* spp., *Flammulina velutipes*, *Grifola frondosa*, *Hypsizygus marmoreus*, *Lentinula edodes*, *Pholiota nameko*, *Pleurotus* spp., *Tremella fuciformis* y *Volvariella volvacea*. En años recientes, se ha cultivado también varias nuevas especies de hongos comestibles, entre ellos, *A. cylindracea*, *Cantharellus cibarius*, *Dictyophora indusiata*, *Hericiium erinaceus*, *Lepista nuda*, *Pleurotus citrinopileatus* y *Stropharia rugoso-anulata* (5).

El cultivo de hongos se ha popularizado en todo el mundo. En 1999, la producción mundial de hongos cultivados fue estimada en más de 7 millones de toneladas. La producción mundial de hongos se ha incrementado durante las últimas dos décadas, de 1.2 millones de toneladas en 1981 a 6.2 en 1997, siendo China el más grande productor, consumidor y exportador de hongos (5).

## 1. Cultivo de hongos comestibles en Guatemala

En el año 1977, se estableció la primera planta productora de *Agaricus bisporus* y su actividad continúa hasta ahora. En la actualidad, cuatro compañías cultivan también este hongo y todas utilizan paja de trigo como sustrato. La producción de *Agaricus* en Guatemala es de 68,504 kg por año, el 70% de esta producción se consume en el país y el resto se exporta (9).

La primera planta productora de *L. edodes* se estableció en 1984, utilizando troncos de *Quercus* como sustrato. La producción comercial de *Pleurotus* inició en 1986, utilizando paja de trigo y pulpa de café como sustrato. La producción anual de *Pleurotus* es de aproximadamente de 29,580 Kg y la mayoría se consume en Guatemala. Este tipo de hongo se vende en los mercados y supermercados, aunque inicialmente fue consumido por los franceses e italianos residentes en Guatemala (9).

La producción total de hongos comestibles en Guatemala ha sido estimada en 132,104 kg por año, incluyendo *A. bisporus* y *A. bitorquis* (51.9%), *L. edodes* (25.7%), y *Pleurotus* spp. (22.4%) (9).

En el país también se han realizado estudios sobre la producción en cultivo *in vitro* de cuerpos fructíferos de una cepa guatemalteca de *Auricularia* aff. *fuscusuccinea* proveniente de una finca del municipio de San Rafael Pie de la Cuesta, San Marcos. De igual forma, se han efectuado estudios sobre la fisiología del crecimiento micelial de cepas guatemaltecas y extranjeras de *Agrocybe aegerita* (10-12).

También, varias especies de *Pleurotus* (*P. djamor*, *P. ostreatus* y *P. levis*), fueron cultivadas a nivel artesanal en 205 módulos ubicados en el occidente del país, logrando producir alrededor de 1,200 libras durante el año 2005 (13).

Por otra parte, a partir de dos cepas nativas de *P. djamor* y dos de *P. ostreatus*, se obtuvieron tres cruas mejoradas en cuanto a su crecimiento micelial y eficiencia biológica sobre el sustrato de olote de maíz, a través del entrecruzamiento de micelio monocariótico. Dichas cepas mejoradas se consideran promisorias para su cultivo en comunidades rurales (14).

#### **D. *Schizophyllum commune* Fr.**

El género *Schizophyllum* tradicionalmente se ha incluido en el orden de los Agaricales, debido a que la ontogénesis de sus láminas tiene una peculiar homología con las láminas de los Agaricales. Sin embargo, se ha señalado también que posee afinidades con los Aphylophorales (15).

Actualmente se clasifica en el Phylum Basidiomycota, Clase Basidiomycetes, Subclase Agaricomycetidae, Orden Agaricales, Familia *Schizophyllaceae* (16).

##### **1. Características macro y microscópicas del basidiocarpio**

Píleo de 0.4 a 2.5 cm de largo y 0.7 a 3.0 cm de ancho; con forma de concha, espatulado a semicircular; superficie cubierta por pelos finos y suaves de color blanco a gris-rosáceo. Contexto de 0.1 a 0.3 cm de ancho, gris rosáceo. Olor y sabor no distintivos. Himenio formado por lamelas grises, algunas veces con tonos rosáceos, próximas, dispuestas radialmente, con pelos suaves y finos en el dorso, de 0.1 a 0.2 cm de ancho; con lamélulas. Cuerpos fructíferos adheridos lateralmente al sustrato, aunque algunos pueden presentar un estípite pequeño de 0.3 a 0.8 cm de longitud y 0.3 a 0.5 cm de ancho, con las mismas características de textura de la superficie del píleo. Esporada blanca (17).

Las esporas miden de 3.0 a 5.0 por 1.0 a 2.0  $\mu\text{m}$ , cilíndricas a ovaladas, hialinas y lisas. Los basidios miden de 15.0 a 22.0 por 4.0 a 5.0  $\mu\text{m}$ , hialinos, cilíndricos, con la base angosta (4).

## 2. Características miceliales

**a. Características coloniales:** Crecimiento moderadamente rápido, cubre completamente las cajas de petri en 3 semanas (2.0 cm/semana), cuando se incubaba a 25°C en oscuridad; el micelio crece en los bordes de la caja después de 4 semanas. En la zona de avance, el micelio es hialino y compacto, cerca del inóculo se observa micelio aéreo, color blanco mate. La colonia es de textura algodonosa que se torna flocosa, con pequeños conglomerados de micelio compacto, después de cuatro semanas el reverso de la colonia se torna amarillento. Olor levemente afrutado. Se forman cuerpos fructíferos cerca de los bordes de la placa después de 6 semanas (18).

**b. Características hifales:** Zona de avance con hifas hialinas, septadas-nodosas, de pared delgada, ramificadas, de 2.0 a 4.0  $\mu\text{m}$  de diámetro. Micelio superficial y sumergido con hifas hialinas, septadas-nodosas, de pared delgada, ramificadas, de 1.5 a 9.0  $\mu\text{m}$  de diámetro (18).

## 3. Tipo de incompatibilidad sexual

Heterotálica y tetrapolar, es decir que la fecundación solo puede tener lugar entre dos micelios homocarióticos de genotipos diferentes para dos genes: los genes de incompatibilidad sexual o de tipo acoplamiento. Los hongos heterotálicos se prestan bien a la mejora genética debido a que es fácil obtener micelios homocarióticos y por lo tanto, es fácil dominar y controlar los cruzamientos que se deseen hacer con ellos (5, 19).

Los estudios con *Schizophyllum commune* proveen el marco de referencia para la investigación con hongos comestibles heterotálicos, ya que generalmente estas especies muestran un cercano paralelismo en cuanto a las consideraciones de los moduladores tipo Loci y la morfogénesis sexual. Esta especie se cuenta entre los hongos filamentosos de importancia especial para la investigación básica en basidiomycetes (5).

#### **4. Ciclo de vida**

En *S. commune*, una basidiospora (meiospora) germina para producir micelio monocariótico haploide. Dos complejos sexuales de compatibilidad opuesta controlan la compatibilidad sexual en los monocariones y regulan el mantenimiento del estado dicariótico. La fusión del micelio haploide monocariótico sexualmente compatible, resulta en la formación del micelio dicariótico. Las hifas de los dicariones, desarrollan fíbulas en cada septo, mientras que las hifas monocarióticas no lo hacen. El dicarion es la estructura vegetativa predominante en *S. commune* y en la mayoría de los basidiomycetes. Bajo condiciones apropiadas el dicarion produce los cuerpos fructíferos, en los cuales ocurre la meiosis. El micelio monocariótico y dicariótico es capaz de crecer indefinidamente, permitiendo el mantenimiento y duplicación del genotipo (20).

#### **5. Hábitat**

Crece únicamente sobre madera, ya sea en ramas o troncos en descomposición. Es capaz de sobrevivir en época seca, en madera expuesta al sol (17).

#### **6. Distribución**

Amplia, en todo el mundo (17). En Guatemala ha sido encontrado en las regiones de Flores y Parque Nacional Tikal (Petén) (21, 22). Se ha reportado también en Cobán, San Pedro Carchá, San Juan Chamelco y Tactic (Alta Verapaz) (21-25). Biotopo del Quetzal (Baja Verapaz); Playa Dorada Lago de Izabal, La Esmeralda Río Dulce y Biotopo Chocón Machacas Livingston (Izabal), Chichicastenango (El Quiché) (21, 26); Chipotón, Sumpango y Antigua Guatemala, (Sacatepéquez) (27). Jacaltenango y San Mateo Ixtatán (Huehuetenango) (24); Tecpán (Chimaltenango) (28) y en San Juan Sacatepéquez (Guatemala) (29, 30).

La amplia distribución de este hongo, según observaciones iniciales, sugiere que se debe a la capacidad de dispersión de esporas a largas distancias, frecuentemente entre poblaciones intercontinentales. Muestreos de aire realizados en el Caribe, reportaron que las esporas de *S. commune* son muy abundantes, con un radio de sedimentación estimado de 18 esporas/m<sup>2</sup>/h (31).

## 7. Etnomicología

En Guatemala se vende en grandes cantidades en el mercado de Cobán y municipios cercanos, donde se le conoce como asam en el idioma Q'eqchi'. Al igual que en Cobán, este hongo se vende en los mercados de Petén. Los pobladores de esta región refieren que es llevado a los mercados por los nativos de las aldeas cercanas, quienes lo colectan del llamado palo de jiote, palo de chacaj o indio desnudo, donde crece en conjuntos. Además, preparan un platillo tradicional, muy popular, llamado igual que el hongo en idioma maya: "xikin che" (21).

Su consumo se ha reportado también en Tactic (Alta Verapaz), donde se conoce como Isem en idioma Poqomchi'. Se utiliza en Jacaltenango y San Mateo Ixtatán (Huehuetenango), donde es llamado Esem y 'Asn en los idiomas Popti' y Chuj, respectivamente. Se conoce también en Tecpán (Chimaltenango) con el nombre de xikin kuk en idioma Kaqchikel (21, 28, 32).

También se emplea en poblaciones de Oaxaca, Veracruz y Quintana Roo, México, en donde se vende en los mercados populares (4). *S. commune*, tiene también un alto valor cultural en los mercados de la región tropical de México (Oaxaca, Veracruz y Tabasco), dada su abundancia de venta, la preferencia de los consumidores y la elaboración de la comida tradicional denominada "mone" (33).

## 8. Propiedades medicinales

En la medicina tradicional china, *Schizophyllum commune* se utiliza en forma de infusiones contra la leucorrea. Este hongo produce el polisacárido inmunoestimulante schizophylano o sonifilano ((1 → 3)-β-D-glucano con ramificaciones (1 → 6)-β-D-glucosil), el cual se utiliza ampliamente para el tratamiento de cáncer cervical (5, 24-36).

## 9. Estudios bioquímicos

Se ha evaluado la inducción de síntesis de xilanasa y celulasa (endoglucanasas) en *S. commune*, utilizando varios mono, oligo y polisacáridos. La formación de ambas enzimas se indujo por medio de la utilización de celulosa o sustratos ricos en celulosa, de los cuales la celulosa bacteriana fue el mejor inductor, así también el disacárido celobiosa. Otros compuestos estructuralmente relacionados, incluyendo soforosa, lactosa, y 4-O-β-galactopiranosil-D-manopiranososa, provocaron la síntesis significativa de ambas enzimas. El xilano aislado de madera de abedul, xilosa, y β-metil-D-xilósido, un análogo estructural de la xilobiosa, no indujo la formación de xilanasa. Los resultados obtenidos indicaron que la síntesis de xilanasa y celulasa parece estar bajo control de un regulador común en *S. commune* (37).

## 10. Cultivo de *S. commune*

*S. commune* no se ha cultivado a nivel mundial para la producción de cuerpos fructíferos con fines comestibles, únicamente se ha cultivado para estudios genéticos y bioquímicos (5).

## E. Crecimiento en medios de cultivo

Este hongo se desarrolla adecuadamente en medios de cultivo para hongos, como agar papa dextrosa, agar extracto de malta al 2% y en el medio extracto de levadura a una temperatura de 27°C y una humedad relativa del 70% (38, 39).

## **F. Factores ambientales y fructificación**

Se ha demostrado el efecto inhibitorio del dióxido de carbono sobre la fructificación de *S. commune*, cuando se colocaron placas inoculadas con micelio dicariótico en desecadores que contenían KOH para absorber CO<sub>2</sub>. El KOH mantuvo una atmósfera con concentraciones bajas de CO<sub>2</sub> (menor del 5%), observándose la fructificación del micelio dicariótico, mientras que a una concentración del 5% se inhibió completamente la formación de primordios (5).

La fructificación de este hongo se ve estimulada por la remoción o disminución de nutrientes. Tanto en cepas poco fructíferas como las que tienen buenas capacidades genéticas de fructificación, ésta puede inducirse frecuentemente cortando con un bisturí el micelio vegetativo. Los cuerpos fructíferos aparecen en el borde del corte. Comúnmente se forman cuerpos fructíferos en el borde de las cajas de petri (5).

También se indujo la formación de primordios por medio de la suplementación con tiamina, un requerimiento conocido para la fructificación. Se encontró que se requiere una fuente de carbono para el crecimiento de los primordios, pero en la formación de píleos no se requiere nutrientes. De hecho, si se añade glucosa, el desarrollo de los píleos se inhibe. En experimentos simultáneos donde se estudió la fructificación en cultivos en desarrollo, se encontró que la fructificación no se inhibió con suplementos continuos de glucosa (5).

## **G. Factores multigénicos para la fructificación**

Raper y Krongelb en 1,958, realizaron un extenso estudio de la fructificación de *S. commune* utilizando una muestra mundial que contenía 80 cepas monacarióticas, las cuales se hibridaron en todas las combinaciones posibles. Teóricamente debían obtenerse 3160 dicariones, excepto que hubo 60 casos en los cuales los monocariones fueron incompatibles entre sí, entonces solamente se obtuvo 3100 dicariones. Se estudió la habilidad de fructificar de estos dicariones

bajo condiciones estándar de ambiente y nutrición. El análisis de los cuerpos fructíferos se realizó a intervalos de tiempo por 6 semanas (5).

A partir de las observaciones de esta muestra, se hicieron las siguientes generalizaciones (5):

- La mayoría de los dicariones fructificaron durante el período de 6 semanas.
- Los dicariones mostraron variabilidad en el tiempo de fructificación y en la morfología de los cuerpos fructíferos.
- La rápida y abundante fructificación fue característica de dicariones compuestos por ciertas cepas.
- La lenta y poca fructificación fue característica de dicariones compuestos por cepas distintas a las señaladas en el inciso anterior.
- Cuando los dicariones estaban compuestos por una cepa que fructificaba rápida y abundantemente; y por otra cepa, que tenía una pobre y lenta fructificación, frecuentemente fructificaban de buena forma.

Se observó que la forma de fructificación se hereda genéticamente, y que la buena fructificación domina sobre la pobre. También se encontró que la competencia en la fructificación era definitivamente heredada, pero esto no pudo ser explicado sobre las bases de un solo gen para la fructificación, con alelos alternados dominantes y recesivos para una buena o pobre fructificación, respectivamente (5).

Finalmente se concluyó que el control genético de la fructificación de este hongo es poligénica, con los genes de la cepa que fructifica adecuadamente enmascarando a los de la cepa poco fructífera. Raper y Krongelb catalogaron las cepas homocigotas utilizadas en su estudio como fructíferas, intermedias y pobres. Cualquier combinación que incluyera una cepa fructífera, tendría una fructificación rápida y adecuada (10).

## VI. JUSTIFICACION

Los recursos genéticos de los hongos tienen un alto interés para la alimentación humana y animal. La recolecta de hongos comestibles, involucra la bioprospección, el estudio, la conservación y el uso de cepas de este género con diferentes finalidades y objetivos, en aspectos de investigación ambiental, agrícola, farmacéutica y taxonómica (40). En este sentido, los procesos de bioprospección, tienen características que involucran la interacción entre el conocimiento tradicional que poseen las comunidades locales e indígenas y las actividades comerciales propias de industrias relacionadas con productos derivados de la biodiversidad (41).

*Schizophyllum commune* es un hongo comestible que se emplea en varias regiones de Guatemala, donde se vende en los mercados populares, considerándose por muchas personas un excelente sustituto de la carne y vegetales por su alto contenido de proteínas y minerales, conteniendo además aminoácidos esenciales y polisacáridos (21). En este país, donde gran parte de la población trabaja en la agricultura y tiene una nutrición inadecuada, el cultivo de especies nativas sobre desechos agrícolas y forestales es una buena alternativa para fortalecer programas de seguridad alimentaria (13).

Gracias a los estudios financiados por la Universidad de San Carlos de Guatemala, se han aislado cepas nativas de esta especie, a partir de especímenes provenientes de las localidades donde se comercializa y se utiliza como alimento. A través de su estudio, estas cepas pueden ser utilizadas como una alternativa alimenticia y económica, mediante la producción de cuerpos fructíferos, los cuales pueden utilizarse tanto para el autoconsumo como para la venta.

Por lo tanto, es necesario iniciar el estudio de estas cepas nativas, evaluando su crecimiento en diferentes medios de cultivo y temperaturas para describir sus características macro y microscópicas; con el fin de generar una tecnología que posteriormente podría utilizarse para el cultivo en regiones rurales del país.

## VII. OBJETIVOS

### A. General

Documentar el crecimiento micelial y las características morfológicas de cepas nativas de *Schizophyllum commune*, en diferentes medios de cultivo y temperaturas de incubación.

### B. Específicos

1. Determinar el medio de cultivo (PDA, EMA, CZD) y la temperatura de incubación (18 y 26°C) donde las cepas presenten un mayor crecimiento, a través de la evaluación del diámetro de las colonias.
2. Describir las características macro y microscópicas de cultivo *in vitro*, obtenidas en diferentes medios de cultivo (PDA, EMA, CZD) y temperaturas de incubación (18 y 26 °C).

## VIII. HIPOTESIS

Las cepas de *Schizophyllum commune* evidencian un mayor diámetro de crecimiento miceliar en por lo menos un medio de cultivo a 26°C.

## IX. METODOS

### A. Revitalización de las cepas de *Schizophyllum commune*:

- Las cepas que se utilizaron en este estudio pertenecen al cepario de hongos saprobios y micorrícicos del Departamento de Microbiología, Escuela de Química Biológica; Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia. Las cepas fueron las siguientes:

**Tabla 1. Procedencia y registros de las cepas**

Registro en el cepario	Procedencia
52.03	Jacaltenango, Huehuetenango
46.02	Tactic, Alta Verapaz
296.02	Tecpán, Chimaltenango
30.07	Poptún, Petén
108.01	Carchá, Alta Verapaz

- Las cepas se revitalizaron sembrándolas en agar PDA y se incubaron a 26°C, por 20 días.

### B. Determinación de la velocidad de crecimiento micelial de cada una de las cepas, a diferentes temperaturas y medios de cultivo (42):

- Se prepararon los medios de cultivo agar extracto de malta (EMA) y agar papa dextrosa (PDA), agar Czapek-Dox (CZD),
- Los medios se esterilizaron por 15 minutos a 121°C.
- Se tomó el pH de los medios preparados.
- Se inocularon 20 cajas de cada uno de los medios, con cada una de las cepas revitalizadas, con un segmento de 0.5 mm del cultivo.

- Las cajas de Petri conteniendo los medios de cultivo, se identificaron con referencia, nombre de la cepa, fecha de inoculación, medio, temperatura de incubación y número de repetición.
- Las cajas inoculadas se sellaron con papel parafilm, para evitar su deshidratación.
- Las cajas inoculadas con las cepas se incubaron a las temperaturas de 18 y 26°C, hasta que el micelio cubrió toda la superficie de la caja de petri de 84 mm.
- Se anotó la velocidad de crecimiento determinando el diámetro de la colonia en dos planos perpendiculares cada 3 días, obtenido en cada uno de los medios y a diferentes temperaturas. Se sumó y dividió entre dos para calcular el promedio del diámetro (mm), durante un máximo de 43 días.
- Los valores de crecimiento micelial se anotaron en la hoja de toma de datos (Anexo 11).
- Se elaboró una base de datos en una hoja electrónica del programa EXCEL<sup>®</sup>, colocando los datos de las repeticiones en forma vertical, ingresando los datos en columnas identificados como: cepa, temperatura de incubación, medio de cultivo, día de lectura, diámetro de la colonia.
- Para establecer las comparaciones en el crecimiento micelial se tomó como punto de corte, el día que la primera cepa llenara la caja de petri, en cualquiera de los medios evaluados.
- Los datos obtenidos, se analizaron en el programa estadístico SPSS 16.0<sup>®</sup>, importando los datos desde la hoja de cálculo elaborada en el programa Excel.
- Se determinó la media y desviación estándar del diámetro del crecimiento obtenido, de cada cepa en los medios de cultivo y temperatura.
- Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía y también un análisis post-ANOVA, utilizando la prueba de comparaciones múltiples de DUNCAN.

### **C. Determinación de las características macro y microscópicas de las colonias (38).**

- Las colonias de las cepas se describieron macroscópicamente con ayuda de un estereoscopio. Se observó el color (anverso y reverso), textura, micelio aéreo y olor.
- Se caracterizó microscópicamente el micelio de las colonias, en un aumento de 100X, preparando tinciones en fresco con azul de lactofenol o floxina-rojo congo. Se midió el diámetro de las hifas, observar el tipo de pared, ornamentación de las hifas, presencia de fíbulas, clamidosporas, apresorios, hifas en espiral, cuerpos pectinados y cualquier otra forma hifal.

#### **1. Diseño**

El diseño de la investigación se elaboró de acuerdo con los objetivos presentados:

- a. Objetivo 1: Determinación del medio de cultivo (PDA, EMA, CZD) y la temperatura (18 y 26°C) de incubación donde las cepas presentaron un mayor crecimiento, a través de la evaluación de la velocidad de crecimiento miceliar.
  - Diseño factorial: 5 x 3 x 2 x 3.
    - 5 cepas: 52.03, 46.02, 296.02, 02.08 y 30.07.
    - 3 medios: Agar Papa dextrosa (PDA), agar Extracto de malta (EMA) y agar Czapeck-Dox (CZD).
    - 2 temperaturas: 18 y 26°C.
    - 3 Días de medición: 3, 5 y 8 días de incubación.

Réplicas: 20

#### **b. Objetivo 2:**

Se describieron las características macro y microscópicas de cultivo *in vitro*, obtenidas en diferentes medios de cultivo (PDA, EMA, CZD) y temperaturas (18 y 26°C), para documentar las características

morfológicas de las colonias y los tipos de hifas que exhibieron cada una de las cepas.

## **2. Análisis de la información**

### ***Objetivo 1:***

Se efectuó un análisis de varianza y una prueba de intervalos múltiples de Duncan ( $\alpha = 0.05$ ), para evidenciar las diferencias estadísticamente significativas en función del diámetro del crecimiento de las cepas en los medios de cultivo y temperaturas, con la ayuda del programa estadístico SPSS versión 16.0<sup>®</sup>. Además se elaboraron tablas y gráficas de interacción.

### ***Objetivo 2:***

Se describieron las características macro y microscópicas de cada una de las cepas en los diferentes medios de cultivos y temperaturas. Además, se elaboraron tablas y se incluyeron fotografías.

## X. RESULTADOS

El estudio comparativo del crecimiento micelial de las cepas de *S. commune* en los medios de cultivo evaluados, reveló que la cepa 52.03 fue la que desarrolló el mayor crecimiento micelial a 26°C, alcanzando colonias con diámetro de 48.71 mm en PDA y en EMA presentó colonias de 40.03 mm de diámetro. Esta cepa fue la primera en llenar la caja de petri de 84 mm en un lapso de 8 días en PDA y 10 días en EMA, no así en CZD, donde tardó 19 días. Las cuatro cepas restantes obtuvieron colonias con diámetros inferiores a la cepa antes descrita (Tabla 1).

Las cepas 108.01 y 296.02 mostraron colonias con mayor crecimiento en PDA, mostrando diámetros de 45.16 y 43.98 mm respectivamente, superando en diámetro a las colonias observadas en EMA. En contraste, las cepas 30.07 y 46.02 presentaron colonias con mejor crecimiento en EMA, exhibiendo diámetros de 29.24 y 25.48 mm respectivamente. Las cepas 108.01, 296.02 llenaron la caja de petri en PDA y EMA en 10 días y la cepa 30.07 en 12 días. La cepa 46.02 tardó entre 15 y 17 días en llenar la caja de petri en ambos medios (Tabla 1).

Característicamente, todas las cepas presentaron colonias de menor diámetro en CZD, así como mayor período de crecimiento. Las cepas 52.03 y 108.01 la llenaron en 19 días, las cepas 296.02 y 46.02 en 33 días y la cepa 30.07 tardó más de 43 días (Tabla 1).

No se encontró diferencia estadísticamente significativa ( $p > 0.05$ ) entre el crecimiento micelial de cada cepa en PDA y EMA, pero si existió diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los dos medios anteriores y el CZD (Tabla 1, Grafica 2).

**Tabla 1. Crecimiento micelial de las cepas de *S. commune* incubadas a 26°C durante 8 días.**

Cepa	Medio <sup>1</sup>	Crecimiento micelial (mm)		Período de crecimiento (días) <sup>3</sup>
52.03	PDA	48.71 ± 27.11	a <sup>2</sup>	8
	EMA	40.93 ± 22.02	a	10
	CZD	19.51 ± 7.89	b	19
108.01	PDA	45.16 ± 26.19	a	10
	EMA	40.52 ± 23.12	a	10
	CZD	19.42 ± 9.58	b	19
296.02	PDA	43.98 ± 25.10	a	10
	EMA	40.00 ± 22.05	a	10
	CZD	15.85 ± 6.52	b	33
30.07	PDA	24.93 ± 17.40	a	12
	EMA	29.24 ± 20.29	a	12
	CZD	10.70 ± 5.20	b	> 43
46.02	PDA	23.40 ± 15.35	a	15
	EMA	25.48 ± 13.35	a	17
	CZD	13.13 ± 5.70	b	33

1. PDA: Agar papa dextrosa; EMA: Agar con extracto de malta; CZD: Agar Czapeck-Dox.
2. Diferentes letras en la misma cepa y columna, indican diferencias estadísticamente significativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ( $\alpha=0.05$ ).
3. Días necesarios para llenar completamente la caja de petri de 84 mm de diámetro.

Al final del período de incubación, las cinco cepas de *S. commune* presentaron color blanco en el anverso en todos los medios de cultivo y en el reverso, la mayoría de las cepas no mostraron coloración, con excepción de la cepa 30.07 que presentó color amarillo en EMA. La textura de todas las colonias fue algodonosa con abundante micelio aéreo en PDA y EMA, siendo laxa y con escaso micelio aéreo en CZD (Tabla 2). Asimismo, la forma de las colonias fue circular con crecimiento radial en PDA y EMA, mientras que en CZD no tuvieron forma definida (colonias con “micelio caótico”), al final del período de incubación (Fig. 1 y 2).

En todas las cepas se evidenció exudado que varió de grisáceo, verdoso, amarillo, ámbar y traslúcido en EMA y PDA, sin observarse esta característica en CZD (Tabla 2).

Se percibió olor desagradable en las colonias de la cepa 52.03 en EMA y PDA, así como en las colonias de las cepas 108.01 y 296.02 en EMA. Olor afrutado se presentó en la cepa 46.02 en PDA; mientras que olor mohoso lo presentaron las colonias de las cepas 46.02 en EMA y la cepa 30.07 en PDA. Todas las colonias donde no fue posible apreciar olor fueron aquellas cultivadas en CZD, así como en la cepa 30.07 en EMA y la cepa 108.01 en PDA (Tabla 2).

**Tabla 2. Características macroscópicas de las cepas de *S. commune* incubadas a 26°C, al final del período de incubación.**

Cepa	Medio	Color		Textura	Micelio aéreo	Exudado	Olor
		Anverso	Reverso				
52.03	PDA	Blanco	SC <sup>1</sup>	Algodonosa	Abundante	Traslúcido/ amarillento	Desagradable
	EMA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Grisáceo/ ámbar	Desagradable
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor
46.02	PDA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Café Claro	Afrutado
	EMA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Ambar	Mohoso
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor
108.01	PDA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Amarillo/ambar	Sin olor
	EMA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Verdoso/ambar	Desagradable
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor
296.02	PDA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Amarillento	Afrutado
	EMA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Amarillento	Desagradable
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor
30.07	PDA	Blanco	SC	Algodonosa	Regular	Ausente	Mohoso
	EMA	Blanco	Amarillo	Algodonosa	Abundante	Amarillento	Sin olor
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor

1. Sin cambio de color

En los tres medios de cultivo, las cepas 296.02 y 108.01 presentaron hifas de 2.0 a 7.0  $\mu\text{m}$ . La cepa 52.03 presentó hifas con diámetros entre 1.0 a 6.0  $\mu\text{m}$ , la cepa 30.07 presentó hifas con diámetros de 2.0 a 6.0  $\mu\text{m}$  y la cepa 46.02 hifas con diámetros de 2.0 a 5.0  $\mu\text{m}$  (Tabla 3).

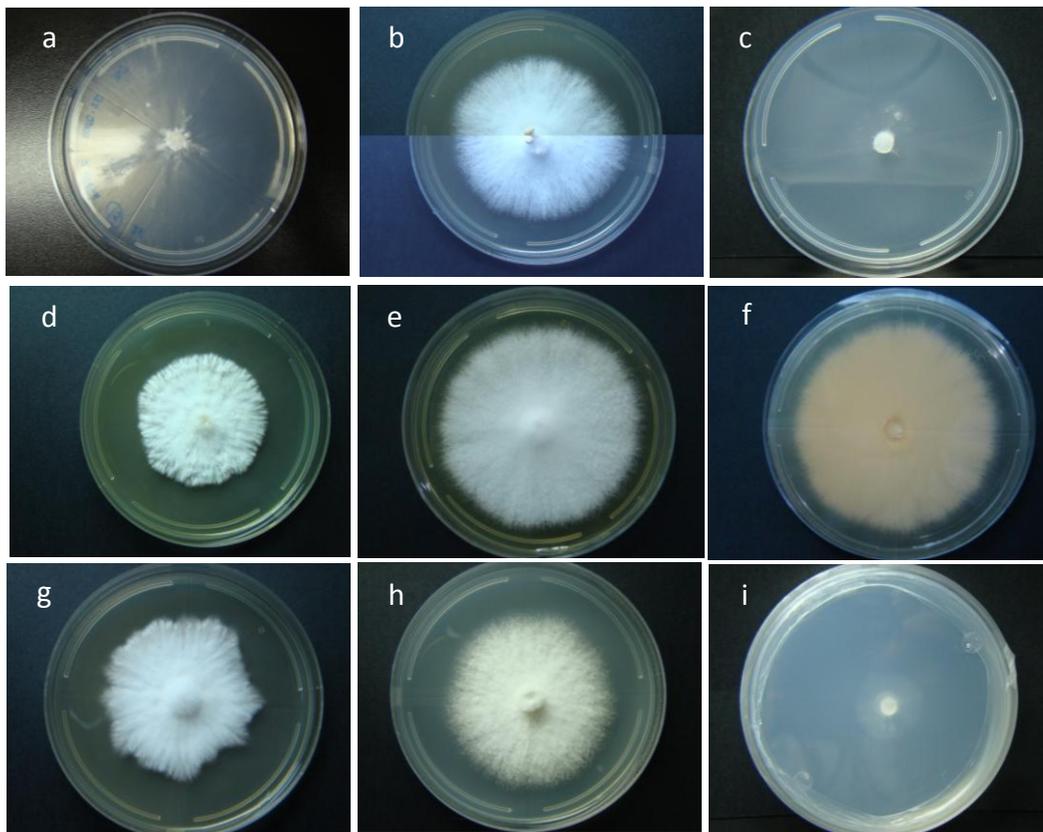
En los tres medios de cultivo, la mayoría de las cepas de estudio evidenciaron la presencia de fíbulas en regular cantidad, a excepción de la cepa 296.02 la cual presentó abundantes cantidad en PDA y EMA, así como la cepa 108.01 en CZD (Tabla 3) (Fig 2).

Todas las cepas exhibieron espículas en escasa, regular y abundante cantidad. La presencia de clamidiosporas solo se presentó en la cepa 30.07 en los tres medios evaluados, así como en las cepas 52.03 y 296.02 en CZD (Tabla 3) (Fig2).

**Tabla 3. Características microscópicas de las cepas de *S. commune* a 26°C, al final del periodo de incubación.**

Cepa	Medio	Diámetro de las hifas ( $\mu\text{m}$ )	Fíbulas	Espículas	Clamidiosporas
52.03	PDA	2.0 – 6.0	Regular	Escasas	Ausentes
	EMA	1.0 – 5.0	Regular	Regular	Ausentes
	CDZ	1.0 – 5.0	Regular	Escasas	Presentes
46.02	PDA	2.0 – 5.0	Regular	Regular	Ausentes
	EMA	2.0 – 5.0	Regular	Abundantes	Ausentes
	CDZ	2.0 – 4.0	Regular	Regular	Ausentes
108.01	PDA	2.0 – 6.0	Regular	Abundantes	Ausentes
	EMA	2.0 – 7.0	Regular	Regular	Ausentes
	CDZ	2.0 – 4.0	Escasas	Escasas	Ausentes
296.02	PDA	2.0 – 7.0	Abundante	Regular	Ausentes
	EMA	2.0 – 6.0	Abundante	Escasas	Ausentes
	CDZ	2.0 – 4.0	Escasas	Escasas	Presentes
30.07	PDA	2.0 – 5.0	Regular	Regular	Presentes
	EMA	2.0 – 6.0	Regular	Regular	Presentes
	CDZ	2.0 – 5.0	Regular	Escasas	Presentes

El análisis comparativo del crecimiento micelial de las cepas de *S. commune* a 18°C en los medios de cultivo, mostró que la cepa 52.03 fue la que desarrolló el mayor crecimiento micelial, alcanzando colonias con diámetro de 27.24 mm en PDA. En EMA presentó colonias de 25.60 mm de diámetro. Esta misma cepa llenó la caja de petri en un lapso de 15 días en PDA y EMA, no así en CZD (Tabla 4).



**Figura 1. Características macroscópicas de las colonias de las cepas de *S. commune* a 26°C y 8 días de incubación en los diferentes medios de cultivo. A. Colonia de la cepa 52.03 en CZD. B-c. Colonias de la cepa 296.02. a. PDA. B. EMA. C. CZD. D. Colonia de la cepa 46.02 en EMA. E-f. Colonia de la cepa 108.01 en EMA. E. anverso. F. reverso. G-i. Colonias de la cepa 30.07. g. EMA. H. PDA. i. Reverso de la colonia en CZD.**



**Figura 2. Características microscópicas de las colonias de cepas de *S. commune* a 26°C en los diferentes medios de cultivo. A-b. Cepa 52.03. a. Fibulas en EMA (x1000). B. Clamidosporas en CZD (x400). C. Proyecciones sobre las paredes hifales (espículas) en la cepa 296.02 en PDA (x400).**

Las otras cepas estudiadas presentaron diámetros inferiores a la cepa anteriormente descrita, con la particularidad de que todas ellas exhibieron mayores crecimientos miceliares en EMA (no en PDA), mostrando colonias con diámetros de 21.32, 15.64, 12.86 y 11.79 mm, para las cepas 108.01, 296.02, 46.02 y 30.07, respectivamente (Tabla 4).

Las cepas 108.01 y 296.02 tardaron 17 y 19 días en llenar la caja de petri en PDA y EMA, respectivamente, en tanto que la cepa 46.02 utilizó más de 43 días para colonizar ambos medios, al igual que la cepa 30.07, la cual tardó el mismo tiempo en llenar la caja de petri en PDA. Esta misma cepa utilizó solamente 24 días en llenar la caja de petri en EMA (Tabla 4).

**Tabla 4. Crecimiento micelar de las cepas de *S. commune* durante 8 días de incubación a 18°C.**

Cepa	Medio <sup>1</sup>	Crecimiento micelar (mm)		Período de crecimiento (días) <sup>3</sup>
52.03	PDA	27.24 ± 15.34	a <sup>2</sup>	15
	EMA	25.60 ± 13.53	A	15
	CZD	9.65 ± 3.42	B	> 43
108.01	PDA	19.41 ± 11.46	A	17
	EMA	21.32 ± 11.59	A	17
	CZD	9.8 ± 3.23	B	> 43
296.02	PDA	14.65 ± 7.86	A	19
	EMA	15.64 ± 7.96	A	19
	CZD	8.05 ± 2.06	B	> 43
46.02	PDA	10.00 ± 2.78	A	> 43
	EMA	12.86 ± 4.59	A	> 43
	CZD	5.99 ± 0.55	B	> 43
30.07	PDA	10.55 ± 4.81	A	> 43
	EMA	11.79 ± 7.24	A	24
	CZD	7.54 ± 2.11	B	> 43

1. PDA: Agar papa dextrosa; EMA: Agar con extracto de malta; CZD: Agar Czapeck-Dox.
2. Diferentes letras en la misma cepa y columna, indican diferencias estadísticamente significativas con la prueba de comparaciones múltiples de Duncan ( $\alpha=0.05$ ).
3. Días necesarios para llenar completamente la caja de petri de 84 mm de diámetro.

En todos los casos, el menor diámetro de las colonias se presentó en CZD y consecuentemente, el período de crecimiento utilizado para llenar la caja de petri fue mayor de 43 días (Tabla 4).

Al comparar estadísticamente el crecimiento miceliar obtenido de cada cepa en los tres medios de cultivo, se encontró que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre PDA y EMA. Sin embargo, si existió diferencia ( $p < 0.05$ ) entre los dos medios anteriores y CZD (Tabla 4, Anexos 6-10).

Al final del período de incubación, las colonias de las distintas cepas de *S. commune* presentaron color blanco en el anverso en todos los medios de cultivo, mientras que el reverso, la mayoría de las cepas no presentaron cambio de color, con excepción de la 46.02 y 30.07 en PDA y EMA, donde la coloración fue amarillenta. La textura de las colonias de todas las cepas fue algodonosa con regular o abundante cantidad de micelio aéreo en PDA y EMA, mientras que la textura en CZD fue laxa con escaso micelio aéreo (Tabla 5). Asimismo, la forma de las colonias fue circular con crecimiento radial en PDA y EMA, mientras que no tuvieron forma definida (colonias con micelio caótico) en CZD, al final del período de incubación (Figs. 3, 4).

La presencia de exudado de colores grisáceo a amarillento, solamente se evidenció en las colonias en las cepas 52.03 y 296.02 en PDA, en el resto de colonias no hubo producción de exudado (Tabla 5).

Olor afrutado se percibió en los cultivos de las cepas 46.02, 296.02 y 30.07 en PDA, así como en la cepa 30.07 en EMA. La cepa 108.01 fue la única que presentó olor a fermentado en PDA. El olor fue desagradable para la cepa 52.03 en PDA, así como en las cepas 46.02 y 108.01 en EMA. Todas las colonias en CZD no presentaron olor (Tabla 5).

**Tabla 5. Características macroscópicas de las cepas de *S. commune* a 18°C, al final del periodo de incubación.**

Cepa	Medio	Color		Textura	Micelio aéreo	Exudado	Olor
		Anverso	Reverso				
52.03	PDA	Blanco	SC <sup>1</sup>	Algodonosa	Abundante	Grisáceo/ámbar	Desagradable
	EMA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Ausente	Afrutado
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor
46.02	PDA	Blanco	Amarillento	Algodonosa	Regular	Ausente	Afrutado
	EMA	Blanco	Amarillento	Algodonosa	Regular	Ausente	Desagradable
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor
108.01	PDA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Ausente	Fermentado
	EMA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Ausente	Desagradable
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor
296.02	PDA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Amarillento	Afrutado
	EMA	Blanco	SC	Algodonosa	Abundante	Amarillo	Afrutado
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor
30.07	PDA	Blanco	Amarillento	Algodonosa	Regular	Ausente	Afrutado
	EMA	Blanco	Amarillento	Algodonosa	Regular	Ausente	Sin olor
	CDZ	Blanco	SC	Laxa	Escaso	Ausente	Sin olor

1. Sin cambio de color

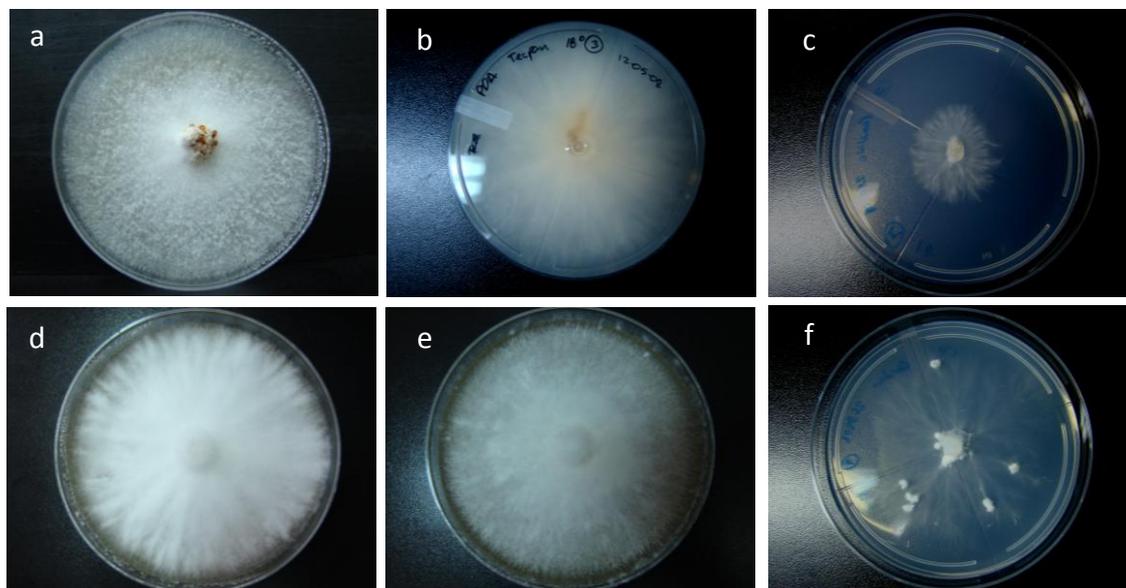
En todos los medios de cultivo, las cepas 52.03 y 296.02 presentaron hifas de 1.0 a 6.0  $\mu\text{m}$ . La cepa 30.07 presentó hifas con diámetros entre 1.0 a 5.0  $\mu\text{m}$ , la cepa 108.01 presentó hifas con diámetros de 2.0 a 6.0  $\mu\text{m}$  y la cepa 46.02 hifas con diámetros de 2.0 a 5.0  $\mu\text{m}$  (Tabla 6).

Todas las cepas evidenciaron la presencia de fíbulas en regular cantidad a abundantes en los tres medios evaluados (Tabla 6).

Todas las cepas exhibieron espículas. La presencia de clamidosporas se observó en la cepa 30.07 en PDA y CZD, en la cepa 180.01 en PDA y en las cepas 52.03 y 296.02 en CZD (Tabla 6).

**Tabla 6. Características microscópicas de las cepas de *S. commune* a 18°C de temperatura de incubación, al final del período de incubación.**

Cepa	Medio	Diámetro de las hifas ( $\mu\text{m}$ )	Fíbulas	Espículas	Clamidiosporas
52.03	PDA	2.0 – 5.0	Abundantes	Regular	Ausentes
	EMA	2.0 – 6.0	Regular	Escasas	Ausentes
	CDZ	1.0 – 5.0	Regular	Escasas	Presentes
46.02	PDA	2.0 – 5.0	Regular	Regular	Ausentes
	EMA	2.0 – 5.0	Regular	Abundantes	Ausentes
	CDZ	2.0 – 4.0	Regular	Regular	Ausentes
108.01	PDA	2.0 – 6.0	Regular	Regular	Presentes
	EMA	2.0 – 6.0	Escasas	Escasas	Ausentes
	CDZ	2.0 – 5.0	Regular	Escasas	Ausentes
296.02	PDA	1.5 – 5.0	Abundante	Abundantes	Ausentes
	EMA	2.0 – 6.0	Abundante	Abundantes	Ausentes
	CDZ	1.0 – 4.0	Regular	Escasas	Presentes
30.07	PDA	2.0 – 5.0	Escasas	Regular	Presentes
	EMA	1.0 – 5.0	Escasas	Escasas	Ausente
	CDZ	1.0 – 4.0	Escasas	Escasas	Presentes



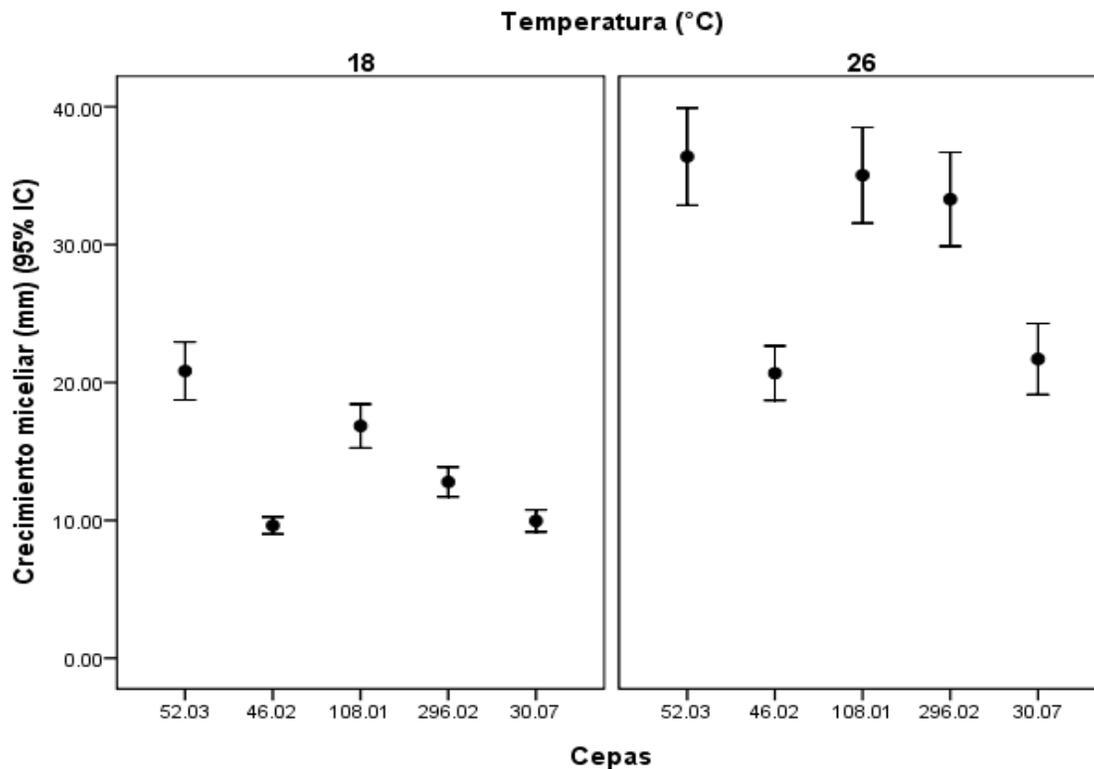
**Figura 3. Características macroscópicas de las colonias de las cepas de *S. commune* a 18°C al final del período de incubación en los medios de cultivo. A. Colonia de la cepa 52.03 en PDA. B. colonia de la cepa 296.02 en PDA, con reverso amarillento. C-d. Colonias de la cepa 46.02 c. CZD, con micelio caótico. D. PDA. E. Colonia de la cepa 108.01 en EMA f. Colonias de la cepa 30.07 en CZD, con el característico micelio caótico.**



**Figura 4. Características microscópicas de las colonias de cepas de *S. commune* a 18°C en los diferentes medios de cultivo.** A. Proyecciones sobre las paredes hifales (espículas), en la cepa 52.03 en PDA (x1000). B. Clamidosporas de la cepa 180.01 CZD (x1000). C. Fíbula de la cepa 296.02 en EMA (x400).

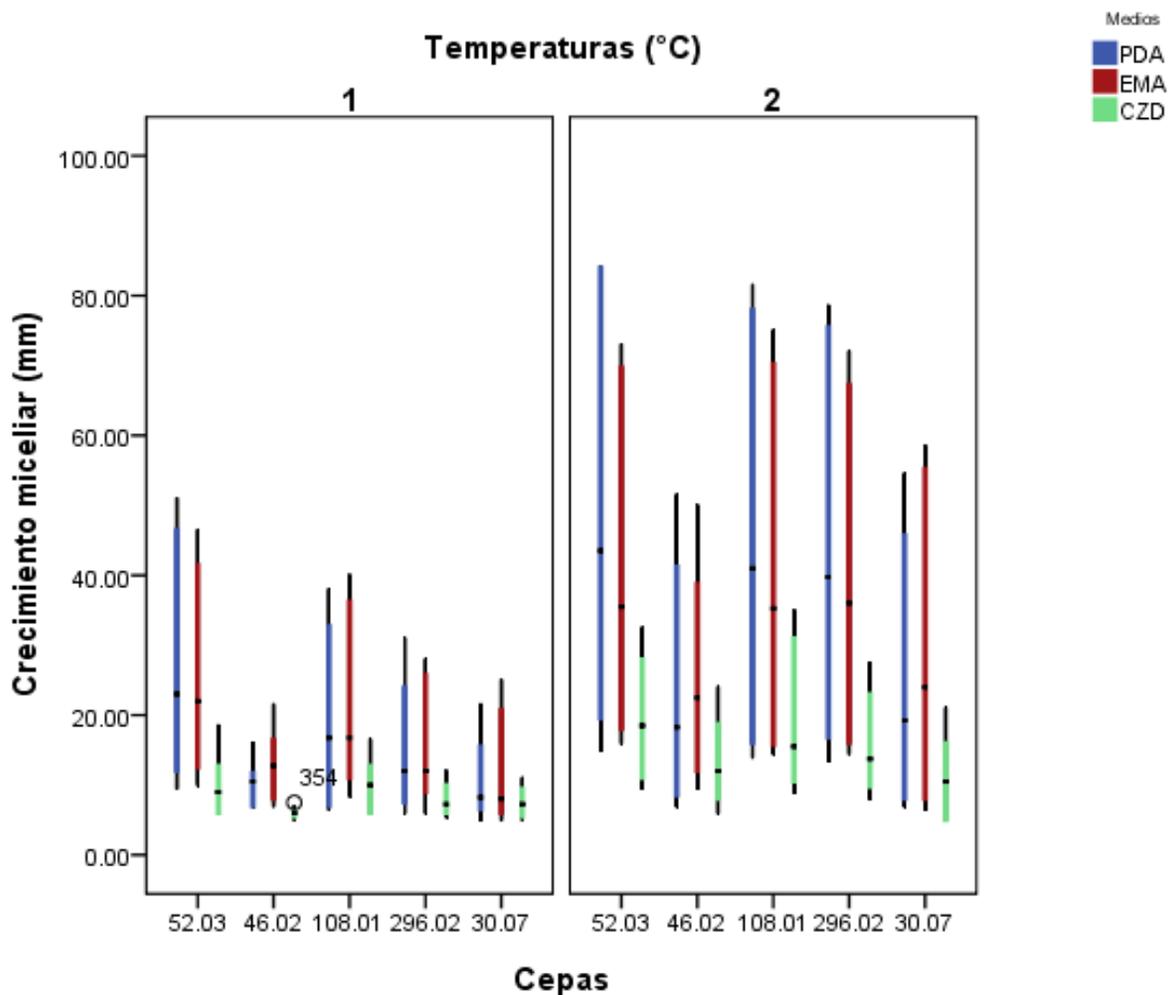
La comparación de todas las cepas de *S. commune* durante 8 días de incubación, reveló que el crecimiento micelial de todas las cepas fue favorecido a 26°C, contrario a lo observado a 18°C. El mejor crecimiento micelial se observó en la cepa la 52.03, seguido de la cepa 108.01, no importando el medio de cultivo estudiado. La cepa con el menor crecimiento fue la 46.02 (Grafica 1)

**Grafica 1. Crecimiento micelial de las cepas *S. commune* durante 8 días de incubación a dos temperaturas.**



Al comparar las cepas de *S. commune* con los tres medios de cultivo se observó que el mejor medio para el crecimiento micelial es PDA a 26°C, con respecto a las cepas 52.03, 108.01 y 296.02. Sin embargo, para las cepas 46.02 y 30.07 fue en EMA. El CZD es el menos adecuado para el crecimiento micelial de todas las cepas tanto a 18°C como a 26°C (Grafica 2).

**Grafica 2. Crecimiento micelial de la todas las cepa *S. commune* durante 8 días de incubación a dos temperaturas, comparando los tres medios de cultivo.**



## XI. DISCUSIÓN

Con respecto a las temperaturas de incubación, a 26°C el crecimiento miceliar de las cepas, presentó mayor vigorosidad, comparado con el crecimiento a 18°C. Este comportamiento observado se puede atribuir a que la mayoría de ellas proceden de regiones donde predomina un clima templado a cálido (con excepción de la cepa 296.02 que procede de clima frío). Al respecto, se ha reportado que aislamientos de *S. commune* precedentes de Costa Rica y Canadá, crecen adecuadamente tanto a temperatura ambiente como a 25°C, lo cual coincide con observado en el presente estudio (18, 38).

Al descenso de la temperatura, se observó la reducción del crecimiento miceliar probablemente por reducción del metabolismo del hongo (5) y la influencia en la fluidez de los lípidos de la membrana celular. Por otra parte, la sensibilidad a la temperatura no solo varía entre cepas, sino también para una misma cepa, según su etapa de desarrollo. Así, es posible y aún frecuente que un hongo tenga una temperatura óptima de germinación y que ésta sea diferente de su temperatura óptima de crecimiento miceliar o de su temperatura óptima de fructificación (49).

Particularmente, a 26°C se observó que las cepas 52.03, 108.01 y 296.02, mostraron el mayor diámetro de crecimiento en PDA, así como también los valores más altos de diámetro de las colonias, mientras que las cepas 30.07 y 46.02 mostraron el mejor crecimiento en EMA, pero, los diámetros de las colonias fueron los más bajos de las cinco cepas evaluadas. Es importante señalar que el crecimiento de aislamientos de *S. commune*, no ha sido reportado en PDA, sino solamente en EMA, donde se indica que aislamientos precedentes de Costa Rica, crecen moderadamente rápido a 25°C (18).

Es importante considerar que el mantener una rápida velocidad de crecimiento miceliar en el medio de cultivo, favorece la reducción de los ciclos de cultivo, cuando una cepa se estudia para producción de cuerpos fructíferos (50). Por tal

razón, se puede decir que a esta temperatura de incubación (26°C), las cepas 52.03, 108.01 y 296.02 fueron las más vigorosas.

A 18°C de temperatura de incubación, se observó que la mayoría de las cepas (108.01, 296.02, 46.02 y 30.07) presentaron su mayor crecimiento en EMA, a excepción de la cepa 52.03, que lo presentó en PDA. Esta conducta observada puede mostrar que el descenso de la temperatura, induce al micelio a necesitar más nutrientes, y, en los medios de cultivo utilizados en esta investigación, el más enriquecido es EMA, ya que está compuesto básicamente por extracto de malta y peptona de harina de soya, lo que provee la mayor calidad de nutrientes utilizables (45, 46). Los requerimientos de las cepas pueden variar según los nutrientes presentes en el medio y el tipo o la concentración óptima de un sustrato utilizable varía si otros nutrientes o factores (temperatura, pH) se encuentran en condiciones subóptimas (49).

Por otra parte, se indica que el menor diámetro del crecimiento de todas las cepas a ambas temperaturas, se observó en CZD. Este medio químicamente definido, contiene nitrato de sodio como única fuente de nitrógeno y es uno de los medios sólidos más utilizados para la producción de clamidosporas, esporulación y no para fructificación (45, 46). Esta podría ser la principal razón por la cual *S. commune* no respondió adecuadamente en cuanto al crecimiento miceliar en CZD, comparado con los otros medios (PDA y EMA).

El diámetro de crecimiento miceliar obtenido en los medios de cultivo a 18°C y 26°C, en las cinco cepas evaluadas, no presentó diferencia significativa entre el crecimiento en PDA y EMA, sin embargo, el crecimiento en ambos medios fue significativamente diferente al observado en CZD.

En conclusión, se señala que las condiciones apropiadas para el cultivo en medio sólido de las cepas evaluadas en esta investigación, son las siguientes: La cepa 52.03 se puede cultivar en PDA, tanto a 18°C como a 26°C. Las cepas 108.01 y 296.02, se pueden cultivar en EMA a 18°C y a 26°C en PDA. Finalmente,

las cepas 30.07 y 46.02 se pueden inocular para su cultivo en EMA, a ambas temperaturas de incubación.

Debido que todas las cepas estudiadas presentaron su mayor crecimiento miceliar en PDA o EMA a 26°C, se acepta la hipótesis planteada.

Con respecto a los períodos de crecimiento (tiempo utilizado para llenar la caja de petri), éstos fueron menores a 26° que a 18°C. En el caso de EMA, coinciden con lo reportado en la literatura, ya que aislamientos de *S. commune* de Costa Rica y Canadá, llenan la caja de Petri en 3 semanas en EMA, tanto a 26°C, como a temperatura ambiente (18, 38).

Con respecto a las características macroscópicas de las colonias de las cinco cepas estudiadas, tanto a 18°C como a 26°C en EMA y PDA, presentaron anverso de color blanco y textura algodonosa con regular o abundante micelio aéreo. Además, las colonias mostraron bordes definidos y un crecimiento miceliar radial, circular o casi circular, lo que coincide con el crecimiento reportado para esta especie en aislamientos de Norteamérica (38). Además, concuerdan con lo reportado para cepas de *S. commune* aisladas en Costa Rica (18).

Una variación en las características macroscópicas anteriormente descritas, fueron las observadas en CZD, tanto a 18°C como a 26°C. En este medio se desarrollaron colonias ramificadas, de forma no bien definida y con escaso micelio aéreo de color blanco. Dichas colonias han sido denominadas en la literatura como “micelio caótico” (micelio laxo y con bordes no definidos) y fueron descritas en cultivos de *S. commune*. Se ha informado que la formación de este tipo de colonias está influenciada por la luz, dado que estas colonias se reportaron solamente cuando los cultivos se incubaron en presencia de luz y no cuando se incubaron en oscuridad (47).

En el presente estudio los cultivos fueron incubados en completa oscuridad, puede suponerse que la baja concentración de nutrientes contenidos en CZD

(conformado por sacarosa, hidrato de sodio, sulfato magnésico, cloruro de potasio, sulfato de hierro e hidrógeno fosfato dipotásico), puede también influir en la aparición de colonias con micelio caótico en *S. commune*.

En cuanto al reverso de las colonias, en general la mayoría de cepas en los medios de cultivo y temperaturas de incubación, no evidenciaron cambio de coloración. Sin embargo, fue posible observar algunas excepciones, tales como las mostradas por las cepas 46.02 y 30.07 a 18°C, en EMA y PDA, las cuales presentaron reversos de color amarillento. Asimismo, la cepa 30.07 fue la única que presentó reverso de color amarillo a 26°C, presentándolo en EMA. El apareamiento de coloración en el reverso en colonias de otras especies de hongos, como las de *Lentinula edodes* y *Pleurotus* spp, pueden indicar la producción de abundantes metabolitos secundarios (no necesarios para el crecimiento micelial y producción de basidiomas) o alguna anomalía en el crecimiento (44), de manera que puede ser una característica no deseable en los cultivos de *S. commune*.

Otro aspecto importante es la presencia de exudado en varios de los cultivos de las cepas, en EMA y PDA y en ambas temperaturas de incubación, aspecto que no se encontró reportado en la literatura consultada (18, 38, 51), sin embargo, se conoce que la presencia de exudado puede significar la producción de metabolitos secundarios (52). Asimismo, los olores reportados para las colonias de *S. commune* son ligeramente afrutado (18) o desagradable (51), los cuales fueron percibidos en las cepas evaluadas. Por otra parte, el olor fermentado presente en algunas colonias, no ha sido documentado y constituye un aporte de la presente investigación.

Dentro de las características microscópicas es importante mencionar que todas las cepas presentaron minúsculas proyecciones sobre las paredes hifales (espículas), las cuales son características de algunas especies como *S. commune* y *Armillaria mellea* (38). Asimismo, el rango de las hifas encontradas en este

estudio, coinciden con lo reportado para la especie (1.0 a 9.0  $\mu\text{m}$ ), sobre las cuales se desarrollan las espículas (18, 38, 51).

La presencia de fíbulas ya sean escasas, regular cantidad o abundantes en todas las cepas, indican el estado dicariótico del micelio y garantizan el mantenimiento de este estado en las puntas de las hifas, como un paso previo a la fructificación en todos los basidiomicetes (5). Por tal razón, la presencia de fíbulas es indicativo de que las cepas cultivadas, formarán los basidiomas cuando se estudien con fines de producción.

La formación de clamidosporas fue observada principalmente en la cepa 30.07, la cual presentó estas estructuras en PDA y CZD a 18 y 26°C, así como en EMA a 26°C. Las cepas 52.03 y 296.02 también las formaron en CZD, tanto a 18°C, como a 26°C y la cepa 108.01 las presentó en PDA a 18°C. Solamente la cepa 46.02 no mostró la formación de estas estructuras. Es importante señalar que las clamidosporas son estructuras de resistencia, que se forman cuando las condiciones ambientales son adversas (5), por lo que su presencia en los cultivos indican condiciones desfavorables para el desarrollo del micelio y por lo tanto no se considera una característica deseable.

Sintetizando todas las características de crecimiento miceliar, macro y microscópicas de las colonias de las cepas estudiadas, se pudo inferir que la cepa 52.03, alcanzó el mayor diámetro de crecimiento miceliar en los medios PDA y EMA, no presentó cambios de color en el reverso de las colonias y tampoco formó clamidosporas, por lo que se considera promisorias para ser cultivadas con fines de productividad.

Por el contrario, la cepa 30.07 presentó los menores diámetros de crecimiento miceliar, coloración en el reverso de las colonias y producción de clamidosporas, características que no son prometedoras para su cultivo en condiciones de laboratorio. Sin embargo, es necesario estudiarla en cuanto a la producción de

metabolitos secundarios tales como inmunomoduladores y otros, los cuales se pueden utilizar con fines medicinales (36).

Finalmente, dado que el crecimiento miceliar no en todos los casos se relaciona con la productividad (50), es necesario realizar estudios de todas las cepas en cuanto a la producción de inóculo y producción de cuerpos fructíferos en diferentes sustratos, con fines alimenticios y medicinales.

## XII. CONCLUSIONES

- A. El medio de cultivo donde la cepa 52.03 presenta el mayor crecimiento miceliar es PDA, tanto a 18°C como a 26°C, mientras que para las cepas 108.01 y 296.02, son los medios EMA a 18°C y en PDA a 26°C. Para las cepas 30.07 y 46.02 es el medio EMA a ambas temperaturas de incubación.
  
- B. Las cepas presentaron colonias con anverso de color blanco y textura algodonosa con regular o abundante micelio aéreo, bordes definidos y un crecimiento miceliar radial, circular o casi circular, en los medios EMA y PDA a 18°C y 26°C, mientras que en el medio CZD a ambas temperaturas de incubación desarrollaron colonias con “micelio caótico”.
  
- C. El reverso de las colonias de las cepas 46.02 y 30.07 a 18°C, en los medios EMA y PDA, fue de color amarillento y la cepa 30.07 presentó reverso de color amarillo a 26°C, en el medio EMA. El resto de cepas y colonias no presentaron cambio de coloración en el reverso.
  
- D. Se observó presencia de exudado en los medios EMA y PDA a 26°C de incubación en todas las cepas estudiadas y los olores percibidos en las colonias fueron afrutado, fermentado y desagradable a ambas temperaturas de incubación.
  
- E. Todas las cepas presentaron minúsculas proyecciones sobre las paredes hifales (espículas) y fíbulas e hifas entre 1.0 a 9.0  $\mu\text{m}$  y la formación de clamidosporas solamente se observó en la cepa 46.02.

### XIII. RECOMENDACIONES

- A. Evaluar las cinco cepas de *S. commune*, en otros medios de cultivo y temperaturas para documentar una mayor cantidad de características fisiológicas de las mismas.
- B. Evaluar las cinco cepas de *S. commune* en cuanto a la producción de inóculo y cuerpos fructíferos, para documentar su productividad.
- C. Realizar pruebas a nivel molecular para determinar la variación genotípica de las cepas de *S. commune* y compararlas con las de otras regiones del mundo.
- D. Investigar las aplicaciones medicinales de las cepas de *S. commune*.

#### XIV. REFERENCIAS

1. Alexopoulos C. Introductory Mycology. 4<sup>a</sup>. ed. USA: John Wiley & Sons Inc. 1996. 896p.
2. Hawksworth, D. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* 1991; 95 (6):641-655.
3. Mueller G. *et al*. Biodiversity of fungi. Inventory and monitoring methods. Elsevier Academic Press. USA 2004. 777p.
4. Guzmán G. Los hongos del Edén, Quintana Roo; Introducción a la micobiota tropical de México. México: Instituto de Ecología 2003. 316p.
5. Chang S., Miles P. Mushrooms cultivation, nutritional value, medicinal effect, and environmental impact. 2a. ed. USA: CRC. Press. 2004. 451p. p193.
6. Mata M. *et al*. Macrohongos de Costa Rica. Costa Rica: Editorial INBio. 2003; Vols. 2, Vol 2, 240p.
7. Huerta G. Generalidades sobre los hongos, con énfasis en los basidiomicetos. En: La Biología y el Cultivo de *Pleurotus* spp. Sánchez J., Royse D. Eds. México, Editorial Limusa 2002. 294p.
8. Quimio T., Chang S. Technical guidelines for mushroom growing in the tropics. Italia: FAO, 1990. 102p.
9. De León R. Cultivation of edible and medicinal mushrooms in Guatemala, Central America. *Micol Apl Int* 2003; 15 (1):31-35.
10. Lau Bonilla D. Factores que afectan el crecimiento micelial y la degradación del sustrato por *Agrocybe aegerita*. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 56p.
11. Vallejo R. Análisis Químico de la paja de cebada sin y con suplemento para el cultivo de *Agrocybe aegerita*. (Tesis de Graduación Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2002. 48p.
12. Andrade, C. Descripción de las características de cultivo *in vitro* de cepas nativas de *Agrocybe aegerita* (Brigant) Singer. Guatemala: Universidad de San

- Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2007. 76p.
13. Bran M.C., *et al.* Producción de inóculo de cepas nativas para estimular el cultivo de hongos comestibles en comunidades campesinas, como alternativa de autoconsumo y comercialización. Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. USAC 2005.
  14. Bran M.C., *et al.* Mejoramiento genético y producción de inóculo de cepas nativas de *Pleurotus* spp. Informe Técnico Final. Dirección General de Investigación. USAC 2006.
  15. Singer R. The Agaricals in modern taxonomy. 3ª. ed. Alemania: J. Cramer GmbH, 1975. 912p.
  16. Hawksworth, D., *et al.* Ainsworth & Bisby's, dictionary of the fungi. 8<sup>th</sup> ed. CAB International. United Kingdom 1995. 616p.
  17. Mata M. Macrohongos de Costa Rica. Costa Rica: Editorial INBio. 1999. Vols.2, Vol 1. 253p.
  18. Carranza J., Ruiz-Boyer A. Cultural studies on some genera of basidiomycetes (Basidiomycota) from Costa Rica. Harvard Papers in Botany 2001; 6 (1): 57-81.
  19. Labarère J., Bois F. La conservación y el uso de los recursos genéticos de *Pleurotus* spp. En: La Biología y el Cultivo de *Pleurotus* spp. Sánchez J., Royse D. eds. México, Editorial Limusa 2002. 294p.
  20. Clark T., Anderson J. Dikaryons of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*: Evolution in long-term culture. Genetics 2004; 167:1663-1675.
  21. Sommerkamp Y. Hongos comestibles en los mercados de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación. Guatemala 1990. 77p.
  22. Rizzo E. Estudio taxonómico de la mycobiota del Parque Arqueológico Tikal. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1999. 75p.
  23. Sommerkamp, Y., Guzmán, G. Hongos de Guatemala, II. Especies depositadas en el Herbario de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

- Rev Mex Mic 1990; 6: 179-197.
24. Bran M. *et al.* Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase III). Universidad de San Carlos de Guatemala. Dirección General de Investigación (DIGI). Informe técnico final. Guatemala 2003; 2003b. 58p.
  25. Bran M. *et al.* Hongos comestibles de Guatemala: Diversidad, cultivo y nomenclatura vernácula. (Fase IV). Universidad de San Carlos de Guatemala, Dirección General de Investigación (DIGI). Informe de Avance 2004. Guatemala 2,004. 60p.
  26. Sommerkamp Y. Estudio de los macromicetos del Biotopo Universitario "Lic. Mario Dary Rivera" para la conservación del quetzal. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1985. 92p.
  27. Herrera K. Estudio etnomicológico en la región de Chipotón Sacatepéquez. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1991. 92p.
  28. Morales O. Estudio etnomicológico de la cabecera municipal de Tecpán Guatemala, Chimaltenango. Universidad de San Carlos de Guatemala (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 2001. 92p.
  29. Sharp, A. Some fungi common to the highlands of México and Guatemala and eastern United States. *Mycologia* 1948; 40:499-502.
  30. Argueta J. Estudio de los macromicetos de la Ciudad de Guatemala, Mixco y San Juan Sacatepéquez. Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala, (Tesis de Graduación, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia) 1983. 86p.
  31. James T., Vilgalys R. Abundance and diversity of *Schizophyllum commune* spore clouds in the Caribbean detected by selective sampling. *Mol Ecol* 2001; 10: 471-479.
  32. Bran M. *et al.* Contribución al conocimiento de los hongos comestibles de Guatemala. Universidad de San Carlos de Guatemala. Facultad de Ciencias

- Químicas y Farmacia. Instituto de Investigaciones Químicas y Biológicas. Revista Científica 2003; 1(1): 2-24.
33. Ruán-Soto, F., *et al.* Process and dynamics of traditional selling wild edible mushrooms in tropical Mexico. *J Ethnobiol Ethnomed* 2006; 2(3):46-59.
34. May G., Adams T. The importance of fungi to man. *Gen Res* 1997; 7:1041-1044.
35. Takeda K., Okumura K. CAM and NK Cells. *Eviden Compl Altern Med* 2004; 1(1): 17-27.
36. Lindequist, U., *et al.* The pharmacological potential of mushrooms. *Eviden Compl Altern Med* 2005; 2(3): 285–299.
37. Haltrich D., Sebesta B. Steiner W. Induction of xylanase and cellulase in *Schizophyllum commune*. En: *Enzymatic Degradation of Insoluble Carbohydrates*. Saddler J., Pender M. eds. Washintong, USA: American Chemical Society 1995. 374p.
38. Nobles, M. Identification of cultures of wood-inhabiting Hymenomycetes. *Can J Bot* 1965; 43:1097-1139.
39. Croan S., Kim Y. Carporogenesis and basidiosporogenesis by *Flammulina velutipes*, *Schizophyllum commune* and *Trametes versicolor in vitro*. U.S.A.: U.S. Department of Agriculture 1999. 16p.
40. Bull, A. *et al.* Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64(3):573–606.
41. Duarte, O. *et al.* La bioprospección como mecanismo de cooperación para la construcción de capacidades endógenas en ciencia y tecnología y análisis de las capacidades de Colombia para adelantar procesos de bioprospección. Resúmenes de las VI Jornadas Latinoamericanas de estudios sociales de la ciencia y la tecnología –ESOCITE-. Bogotá, Colombia, 2006. 50p.
42. Mier T., Toriello C., Ulloa M. Hongos microscópicos saprobios y parásitos: Métodos de Laboratorio. 1ª. Ed. Universidad Nacional Autónoma de México, México, 2002. 34p.

43. Cruieger, W., Cruieger, A. Biotechnology. A text book of industrial microbiology. Sunderland & Sinauer Associates, Madison, Wisconsin, USA. 1984. 308p. p50-51.
44. Stamets, P. Growing and medical mushrooms. Ten Speed Press & Mycomedica. Olympia, WA, USA. 554p. p90, 113.
45. Manual Oxoid. UNIPATH España S.A. 1995. 394p.
46. Microbiology Manual. Merck KGaA 2000. 407p.
47. Kein, K. *et al.* Kinetics of asymmetric mycelia growth and control by dikaryosis and light in *Schizophyllum commune*. *Mycologia* 1997; 89(6): 916-923.
48. Arenas, R. Microbiología. Médica ilustrada. Segunda Edición México, D.F. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2003. 339p.
49. Sánchez, J. Crecimiento y fructificación. *En: La biología y el cultivo de Pleurotus spp.* Ed. LIMUSA, S. A. México. 2001. 294p. p59,
50. Salmones, D. *et al.* Estudios sobre el género *Pleurotus*. VIII. Interacción entre el crecimiento micelial y productividad. *Rev Iberoam Micol* 1997; 14: 173-176.
51. Sutton, D. *et al.* Guide to clinically significant fungi. Ed. Williams & Wilkins, U.S.A. 1998. 471p. p360.
52. Stamets, P. 1993. Growing and medical mushrooms. Ten Speed Press & Mycomedica. Olympia, WA, USA. 554p. p126.

## XV. ANEXOS

### Anexo 1. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 52.03 a 26 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	27437.878 <sup>a</sup>	2	13718.939	32.096	0.000
Intercepto	238347.222	1	238347.222	557.619	0.000
Medio de cultivo	27437.878	2	13718.939	32.096	0.000
Error	75656.400	177	427.437		
Total	341441.500	180			
Total correcto	103094.278	179			

R cuadrado = 0.266 (Ajuste R Cuadrado= 0.258)

### Anexo 2. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 46.02 a 26 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	5245.344 <sup>a</sup>	2	2622.672	17.218	0.000
Intercepto	76921.339	1	76921.339	504.986	0.000
Medio de cultivo	5245.344	2	2622.672	17.218	0.000
Error	26961.317	177	152.324		
Total	109128.000	180			
Total correcto	32206.661	179			

R Cuadrado = 0.163 (Ajuste R Cuadrado = 0.153)

### Anexo 3. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 108.01 a 26 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	22587.769 <sup>a</sup>	2	11293.885	25.811	0.000
Intercepto	220990.272	1	220990.272	505.059	0.000
Medio de cultivo	22587.769	2	11293.885	25.811	0.000
Error	77446.958	177	437.553		
Total	321025.000	180			
Total correcto	100034.728	179			

a. R Cuadrado = 0.226 (Ajuste R Cuadrado = 0.217)

### Anexo 4. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 296.02 a 26 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	27851.911 <sup>a</sup>	2	13925.956	36.038	0.000
Intercepto	199533.606	1	199533.606	516.356	0.000
Medio de cultivo	27851.911	2	13925.956	36.038	0.000
Error	68397.483	177	386.426		
Total	295783.000	180			
Total correcto	96249.394	179			

R Cuadrado = 0.289 (Ajuste R Cuadrado = 0.281)

### Anexo 5. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 30.07 a 26 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	10995.136 <sup>a</sup>	2	5497.568	22.230	0.000
Intercepto	84781.901	1	84781.901	342.821	0.000
Medio de cultivo	10995.136	2	5497.568	22.230	0.000
Error	43773.213	177	247.306		
Total	139550.250	180			
Total correcto	54768.349	179			

R Cuadrado = 0.201 (Ajuste R Cuadrado = 0.192)

### Anexo 6. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 52.03 a 18 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	11324.878 <sup>a</sup>	2	5662.439	39.477	0.000
Intercepto	78145.835	1	78145.835	544.805	0.000
Medio de cultivo	11324.878	2	5662.439	39.477	0.000
Error	25388.537	177	143.438		
Total	114859.250	180			
Total correcto	36713.415	179			

a. R cuadrado = 0.308 (Ajuste R cuadrado = 0.301)

### Anexo 7. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 46.02 a 18 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	1431.386 <sup>a</sup>	2	715.693	73.503	0.000
Intercepto	16665.689	1	16665.689	1.712E3	0.000
Medio de cultivo	1431.386	2	715.693	73.503	0.000
Error	1723.425	177	9.737		
Total	19820.500	180			
Total correcto	3154.811	179			

a. R Cuadrado = 0.454 (Ajuste R Cuadrado = .448)

### Anexo 8. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 108.01 a 18 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	4578.953 <sup>a</sup>	2	2289.476	24.854	0.000
Intercepto	51089.201	1	51089.201	554.616	0.000
Medio de cultivo	4578.953	2	2289.476	24.854	0.000
Error	16304.596	177	92.116		
Total	71972.750	180			
Total correcto	20883.549	179			

### Anexo 6. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 52.03 a 18 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	Df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	11324.878 <sup>a</sup>	2	5662.439	39.477	0.000
Intercepto	78145.835	1	78145.835	544.805	0.000
Medio de cultivo	11324.878	2	5662.439	39.477	0.000
Error	25388.537	177	143.438		
Total	114859.250	180			

R Cuadrado = 0.219 (Ajuste R Cuadrado = 0.210)

### Anexo 9. Análisis de varianza del crecimiento miceliar de la cepa 296.02 a 18 °C.

Variable dependiente: Crecimiento miceliar

Origen	Suma de cuadrados	df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	2038.808 <sup>a</sup>	2	1019.404	23.596	0.000
Intercepto	29414.450	1	29414.450	680.860	0.000
Medio de cultivo	2038.808	2	1019.404	23.596	0.000
Error	7646.742	177	43.202		
Total	39100.000	180			
Total correcto	9685.550	179			

R Cuadrado = 0.211 (Ajuste R Cuadrado = 0.202)

### Anexo 10. Análisis de varianza del crecimiento micelial de la cepa 30.07 a 18 °C.

Variable dependiente: Crecimiento micelial

Origen	Suma de cuadrados	df	Cuadrado de las medias	F	Significancia
Modelo corregido	573.086 <sup>a</sup>	2	286.543	10.736	0.000
Intercepto	17860.272	1	17860.272	669.173	0.000
Medio de cultivo	573.086	2	286.543	10.736	0.000
Error	4724.142	177	26.690		
Total	23157.500	180			
Total correcto	5297.228	179			

R Cuadrado = 0.108 (Ajuste R Cuadrado = 0 .098)

## Anexo 11

Caracterización y producción de cuerpos fructíferos de cepas nativas del hongo comestible Asam  
(*Schizophyllum commune* Fr)

### VELOCIDAD DE CRECIMIENTO MICELIAR

Cepa: \_\_\_\_\_ Medio de Cultivo: \_\_\_\_\_ Fecha de inicio: \_\_\_\_\_ Fecha de finalización: \_\_\_\_\_

Fecha												
Rep.	X	Y	P	X	Y	P	X	Y	P	X	Y	P
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												
13												
14												
15												
16												
17												
18												
19												
20												

Lectura del diámetro de crecimiento miceliar. X: Plano perpendicular Horizontal. Y: Plano perpendicular Vertical. P: Promedio de X & Y.

### Características miceliarias:

Macroscópicas \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Microscópicas \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_